

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09281036 A**

(43) Date of publication of application: **31 . 10 . 97**

(51) Int. Cl.

G01N 21/27
G01N 21/77
G01N 33/72

(21) Application number: **08088253**

(22) Date of filing: **10 . 04 . 96**

(71) Applicant: **SEITAI HIKARI JOHO
KENKYUSHO:KK**

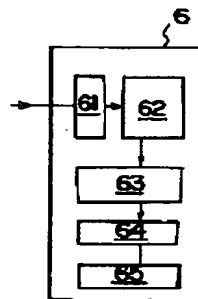
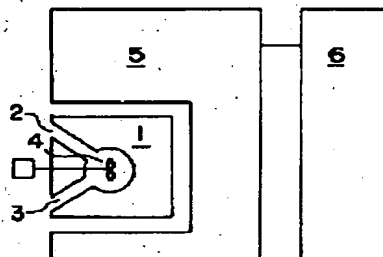
(72) Inventor: **TSUJITA KAZUHIRO
SHIRAISHI TAKUO
KAKINUMA KATSUKO**

(54) **METHOD AND APPARATUS FOR DETECTING NO** COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To detect NO the same distinguishing from NO_2 or NO_3 by mixing a substance containing NO or having possibility producing NO with a solution containing an erythrocyte and measuring the absorbancy of the erythrocyte in the soln. after mixing with respect to at least one wavelength.

SOLUTION: A very small amt. of blood is injected into a measuring matter container 1 from a first injection port 2 and an erythrocyte in blood is spectrally analyzed by a microscopic spectral diffraction part. A soln. to be measured having possibility containing NO is injected into the container 1 from a second injection port 3 to be mixed with already injected blood under stirring by a stirrer 4. After mixing, the erythrocyte in the soln. injected into the measuring matter container 1 is again spectrally analyzed by the microscopic spectral diffraction part 5. The spectrally analyzed result is sent to an analyzed data processing part 6 to be once stored in a temporary memory 62 and successive taken out to be subjected to operation processing in an operation part 63 and it is judged whether NO is contained in the soln. to be measured.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-281036

(43)公開日 平成9年(1997)10月31日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N	21/27		G 0 1 N 21/27	Z
	21/77		21/77	E
	33/72		33/72	Z
				A

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平8-88253

(22)出願日 平成8年(1996)4月10日

(71)出願人 393012286

株式会社生体光情報研究所

山形県山形市松栄2丁目2番1号

(72)発明者 辻田 和宏

山形県山形市松栄2丁目2番1号 株式会
社生体光情報研究所内

(72)発明者 白石 卓夫

山形県山形市松栄2丁目2番1号 株式会
社生体光情報研究所内

(72)発明者 柿沼 カツ子

山形県山形市松栄2丁目2番1号 株式会
社生体光情報研究所内

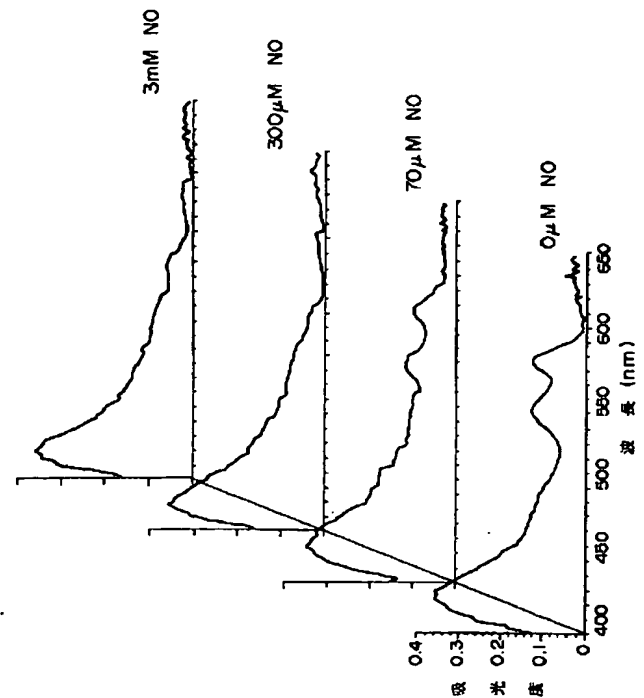
(74)代理人 弁理士 山田 正紀 (外1名)

(54)【発明の名称】 NO検出方法および装置

(57)【要約】

【課題】 NOのほか、 NO_2^- や NO_3^- が混合していることが予想される液体もしくは気体（被測定試料）中のNOを、 NO_2^- や NO_3^- と区別して高感度に検出する。

【解決手段】 赤血球を含有する溶液にNOを含有する可能性のある液体もしくは気体を混合し、その混合の前後において、その溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定し、測定された混合前後の吸光度の変化に基づいてNOを検出する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 赤血球を含有する溶液にNOを含有もしくはは產生する可能性のある物質を混合し、該混合の後において、該溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定し、測定された吸光度に基づいてNOを検出することを特徴とするNO検出方法。

【請求項2】 赤血球を含有する溶液にNOを含有もしくはは產生する可能性のある物質を混合し、該混合の前後において、該溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定し、測定された混合前後の吸光度の変化に基づいてNOを検出することを特徴とするNO検出方法。

【請求項3】 前記混合の前後双方において、前記溶液中の赤血球の、所定の1つもしくは複数の第1の波長における第1の吸光度と、所定の1つもしくは複数の第2の波長における第2の吸光度との双方を測定し、前記混合の前後における、前記第1の吸光度と前記第2の吸光度との変化差もしくは比の変化に基づいて、NOの存在の有無を検出することを特徴とする請求項2記載のNO検出方法。

【請求項4】 前記混合の前後において、前記溶液中の赤血球の、540nmもしくは540nm近傍の波長と、555nmもしくは555nm近傍の波長の各吸光度 Q_1 、 Q_2 を測定し、前記混合の前後における、判別式 $D_1 = Q_1 - Q_2$

の値の変化に基づいて、NOの存在の有無を検出することを特徴とする請求項2記載のNO検出方法。

【請求項5】 540nmもしくは540nm近傍の波長の吸光度に代えて、570nmもしくは570nm近傍の波長の吸光度、ないし、540nmもしくは540nm近傍の波長の吸光度と570nmもしくは570nm近傍の波長の吸光度との平均の吸光度を用いることを特徴とする請求項4記載のNO検出方法。

【請求項6】 前記混合の前後において、前記溶液中の赤血球の、400nmもしくは400nm近傍の波長と、390nmもしくは390nm近傍の波長の各吸光度 Q_3 、 Q_4 を測定し、前記混合の前後における、判別式 $D_2 = Q_3 - Q_4$

の値の変化に基づいて、NOの存在の有無を検出することを特徴とする請求項2記載のNO検出方法。

【請求項7】 赤血球を含有する溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定する顕微分光手段と、赤血球を含有する溶液中の赤血球の、該溶液にNOを含有もしくはは產生する可能性のある物質を混合した後の吸光度に基づいてNOの有無を判定する判定手段とを備えたことを特徴とするNO検出装置。

【請求項8】 赤血球を含有する溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定する顕微分光手段と、

赤血球を含有する溶液中の赤血球の、該溶液にNOを含有もしくはは產生する可能性のある物質を混合する前後の吸光度の変化に基づいてNOの有無を判定する判定手段とを備えたことを特徴とするNO検出装置。

【請求項9】 前記溶液中の赤血球の中から被測定用の赤血球を指定する指定手段を備え、前記顕微分光手段が、前記指定手段により指定された赤血球の吸光度を測定するものであることを特徴とする請求項7又は8記載のNO検出装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、NOのほか、NO₂やNO₃⁻が混合していることが予想される液体もしくは気体（被測定試料）中のNOを、NO₂やNO₃⁻と区別して検出するNO検出方法および装置に関する。

【0002】

【従来の技術】NOは生体内における生理作用に直接関与するラジカルであり、細胞活動の調節に重要な作用を示し、細胞内物質や遺伝子に悪影響を及ぼす。これを簡易に検出することは、医学上、あるいは環境問題等を考える上からも強く求められるところである。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】NOを検出する方法として、従来からいくつかの方法が提案されてきている。例えば、試薬（トラップ剤）を使う方法、あるいは、NO電極を用いる方法等が従来提案されているが、これらの方法では、煩雑な前作業が必要である。また、上記試薬を使う方法のうち、試薬（トラップ剤）としてヘモグロビンを使う方法も試みられているが、ヘモグロビンを使った場合、NOがヘモグロビンと反応する際にNO₂、NO₃⁻もヘモグロビンと反応し、やはり、NOを、NO₂あるいはNO₃⁻と区別して検出することは難しい。

【0004】本発明は、上記事情に鑑み、NOを、NO₂あるいはNO₃⁻と区別して検出することのできるNO検出方法、およびその検出方法の実施に好適なNO検出装置を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成する本発明のNO検出方法のうち第1のNO検出方法は、赤血球を含有する溶液にNOを含有もしくはは產生する可能性のある物質を混合し、その混合の後において、その溶液中の、例えば1つもしくは数個等、比較的少数個の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定し、測定された吸光度に基づいてNOを検出することを特徴とする。

【0006】ここで、上記「NOを含有もしくはは產生す

る可能性のある物質」は特定の物質に限定されるものではなく、例えばNOを含有する可能性のある液体、気体、あるいはNOを産生する可能性のある生体組織等が含まれる。以下同様である。また、上記目的を達成する本発明のNO検出方法のうち第2のNO検出方法は、赤血球を含有する溶液にNOを含有もしくは産生する可能性のある物質を混合し、その混合の前後において、その溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定し、測定された混合前後の吸光度の変化に基づいてNOを検出することを特徴とする。

【0007】ここで、上記本発明の第2のNO検出方法において、混合の前後双方において、溶液中の赤血球の、所定の1つもしくは複数の第1の波長における第1の吸光度と、所定の1つもしくは複数の第2の波長における第2の吸光度との双方を測定し、上記混合の前後における、上記第1の吸光度と上記第2の吸光度との差の変化もしくは比の変化に基づいて、NOの存在の有無を検出してもよい。

【0008】具体的には、例えば、上記混合の前後において、溶液中の赤血球の、540nmもしくは540nm近傍の波長と、555nmもしくは555nm近傍の波長の各吸光度 Q_1 、 Q_2 を測定し、上記混合の前後における、判別式

$$D_1 = Q_1 - Q_2$$

の値の変化に基づいて、NOの存在の有無を検出してもよい。あるいは、540nmもしくは540nm近傍の波長の吸光度に代えて、570nmもしくは570nm近傍の波長の吸光度、ないし、540nmもしくは540nm近傍の波長の吸光度と570nmもしくは570nm近傍の波長の吸光度との平均の吸光度を用いてもよい。

【0009】あるいは、上記混合の前後において、溶液中の赤血球の、400nmもしくは400nm近傍の波長と、390nmもしくは390nm近傍の波長の各吸光度 Q_3 、 Q_4 を測定し、上記混合の前後における、判別式

$$D_2 = Q_1 - Q_2$$

の値の変化に基づいて、NOの存在の有無を検出してもよい。

【0010】本発明は以下の二つの事実の組み合わせを基礎としている。

(a) 生きた赤血球のような、生理的に完全な状態にある細胞の膜は、一般に NO_2^- や NO_3^- のような電荷をもった分子(イオン)を透過しないことが知られている(例えば、B. Alberts et al. ed. "The Cell" 3rd eds. Chap. 11, Garland Publish Inc., New York & London 19 参照)。

【0011】このことから、赤血球を用いることにより、通常、ヘモグロビンとNOとの反応を観察するとき

に伴う、ヘモグロビンと NO_2^- や NO_3^- との反応による妨害の発生が防止される。

(b) ヘモグロビンの光吸収スペクトルは、NOを反応させる前後で変化する。

【0012】図1は、NO濃度による赤血球吸収スペクトルの変化を示す図である。横軸は波長、縦軸は吸光度、奥行きはNOの濃度の相違を表わしている。この吸収スペクトルの変化は、ヘモグロビンとNOとの反応によるものである。ヘモグロビンの光吸収スペクトルは、NOを反応させる前には、400nm付近、540nmならびに570nmに吸収のピークがあるが、反応後には540nmならびに570nmのピークは平坦化し、また、400nm付近のピークは短波長側に移動する。これについては、例えば、M. Kelm et al., Circulation Research, vol. 66, No. 6, pp. 1561-1575 (1990)を参照されたい。

【0013】本発明は、以上の(a)、(b)の2点を基礎として完成されたものであり、本発明は、ヒト、豚、他の小動物等の極微量の血液から容易に得られる、例えば1個もしくは数個等、比較的少数個の赤血球を用いるだけで、他に特別の試薬を使う必要がなく、NOを NO_2^- および NO_3^- と区別して検出できるため、実用上の効果は大きい。

【0014】また、本発明は赤血球を用いることから、その赤血球の細胞膜の特性を利用できる点に加えて、NO検出に赤血球内の高濃度のヘモグロビン(22mM)を使用できるため、高感度の検出が期待でき、さらに個々の赤血球の大きさ程度の位置分解能を持った検出が期待できる。赤血球を用いてNOを検出にあたっては、NOを含有もしくは産生する可能性のある物質を混合する前の赤血球の吸光度はあらかじめわかっている場合が多く、その場合は、上記の物質を混合した後の吸光度を測定しその測定した吸光度に基づいてNOを検出してもよい。ただし、上記物質を混合する前後において吸光度を測定し、それらの吸光度に基づいてNOを検出することがより好ましい。

【0015】また、上記目的を達成する本発明のNO検出装置のうち第1のNO検出装置は、赤血球を含有する溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定する顕微分光手段と、赤血球を含有する溶液中の赤血球の、その溶液にNOを含有もしくは産生する可能性のある物質を混合した後の吸光度に基づいてNOの有無を判定する判定手段とを備えたことを特徴とする。

【0016】また、上記目的を達成する本発明のNO検出装置のうち第2のNO検出装置は、赤血球を含有する溶液中の赤血球の、少なくともある一つの波長に対する吸光度を測定する顕微分光手段と、赤血球を含有する溶液中の赤血球の、該溶液にNOを含有もしくは産生す

る可能性のある物質を混合する前後の吸光度の変化に基づいてNOの有無を判定する判定手段とを備えたことを特徴とする。

【0017】ここで、上記本発明の第1のNO検出装置ないし第2の検出装置において、上記溶液中の赤血球の中から被測定用の赤血球を指定する指定手段を備え、上記顕微分光手段が、指定手段により指定された赤血球の吸光度を測定するものであることが好ましい。本発明のNO検出装置は、顕微鏡下で赤血球を捉えてその赤血球の吸光度を測定するものであり、本発明のNO検出方法を効果的に実施することができる。また、本発明のNO検出装置によれば、赤血球の大きさ程度の位置分解能をもったNO検出を行なうことができる。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施形態について説明する。図2は、本発明のNO検出装置の一実施形態を示す模式ブロック図である。測定物容器1中に赤血球を含有する溶液（ここでは血液）や、その溶液に加え、NOを含有する可能性のある被測定溶液が注入されて、その注入された溶液が顕微分光部5によって観測される。

【0019】この測定物容器1には、第1および第2の2つの注入口2、3が設けられており、第1の注入口2からは、微量の血液が測定物容器1の内部に注入され、顕微分光部5でその注入された血液中の赤血球が分光分析される。本実施形態では、顕微分光部5は、その注入*

$$D_1 = Q_1 - Q_2 - Q \quad (Q \text{は一定量}) \quad \dots (1)$$

の正負が判別される。被測定溶液を血液に攪拌混合する前後における判別式 D_1 の値が正から負に変化したときに、被測定溶液中にNOが存在していたと判定される。一定量 Q は、被測定溶液を攪拌混合する前および被測定溶液中にNOが存在しなかったときに判別式 D_1 が正、被測定溶液中にNOが存在していたときに負になるように、あらかじめ実験データ等によりその値が求められる。

【0023】尚、上記(1)式中の吸光度 Q_1 として、540nmもしくはその近傍の波長の吸光度に代えて、570nmもしくはその近傍の波長の吸光度を用いてもよく、あるいはそれら双方の吸光度の平均値を用いてもよい。また、演算部63では、上記(1)式を判別式として用いるのではなく、あるいはその判別式とともに、400nmあるいはその近傍の波長の吸光度を Q_3 、390nmあるいはその近傍の波長の吸光度を Q_4 としたとき、判別式

$$D_2 = Q_1 - Q_3 \quad \dots (2)$$

の正負を求め、血液に被測定溶液を攪拌混合する前後における判別式 D_2 の値が正から負に変化したときに、その被測定溶液中にNOが存在していたと判定してもよい。

【0024】尚、演算部63におけるデータ演算処理に

*された血液中の、指定されたあるいは自動認識されたいずれか1個もしくは複数個の赤血球の、波長範囲390nm~600nmの吸光度を測定することができるものである。第2の注入口3からは、NOを含有する可能性のある被測定溶液が注入され、攪拌機4により、既に注入されている血液と攪拌混合される。その混合の後、再度、顕微分光部5によって、測定物容器1中に注入されている溶液中の赤血球について分光分析が行なわれる。

【0020】被測定溶液を注入する前後の赤血球の分光分析結果は、分光データ処理部6に送られる。図3は、図2に1つのブロックで示す分光データ処理部の構成を示すブロック図である。入力インターフェイス部61を経由して顕微分光部5から分光データを受けた後、その分光データは第1の一時メモリ62に一旦格納される。

【0021】第1の一時メモリ62から順次取り出された分光データは、演算部63において、後述するデータ演算処理により、被測定溶液中にNOが含まれていたか否かが判定される。その判定結果は、第2の一時メモリ64に格納される。その第2の一時メモリ64の内容は、表示部65によって、NOの有無の判定結果として表示される。

【0022】ここで、演算部63におけるデータ演算処理例について説明する。演算部63では、540nmもしくはその近傍の波長の吸光度を Q_1 、555nmあるいはその近傍の波長の吸光度を Q_2 としたとき、判別式

については、540nm、570nm、400nmあるいはその近傍の波長の吸光度が、他の波長領域の吸光度に比べて、被測定溶液を加える前後において比較的大きく変化することを検出できればよいのであって、上記のデータ処理方法に限定されるものではない。図4は、本発明のNO検出装置のもう1つの実施形態を示す模式ブロック図である。

【0025】測定容器10には、血液が保持され、その測定容器10が光学顕微鏡51にセットされ、白色光で照明され、その測定容器10中の溶液の拡大像が作られる。その拡大像は、音響光可変分波器(AOTF; Acousto-Optical Tunable Filter)52に導かれる。このAOTF52を通過した、0次回折光(白色光で照明されたままの像)と一次回折光(特定波長による像)はテレビカメラ521に導かれ、そのテレビカメラ521により撮像される。尚、この実施形態では光学顕微鏡51とAOTF52との組合せが、本発明にいう顕微分光手段の一例である。

【0026】AOTF52の分光特性(選択波長)は高周波発振器524の出力周波数によって制御される。従って、分光波長(一次回折光の波長)は高周波発振器524の発振周波数を指定することによって決定される。また、高周波発振器524の出力周波数を掃引すると分

光波長は連続的に変化する。高周波発振器 5 2 4 の出力周波数はコンピュータ 6 0 によって制御される。

【0 0 2 7】画像処理装置 6 0 1 は、コンピュータ 6 0 の指示を受けて、テレビカメラ 5 2 1 で撮られた像を記憶し、その像をモニタ装置 6 0 2 に表示し、さらにコンピュータ 6 0 に接続された座標指示器 6 0 3 の操作に連動してモニタ装置 6 0 2 の画面上の特定点を指定し、その指定された特定点の分光特性データをコンピュータ 6 0 に出力する等の機能をもつ。

【0 0 2 8】表示器 6 5 はモニタ装置 6 0 2 とは別に備えられており、この表示器 6 5 には、コンピュータ 6 0 によって処理された各種の分光データが表示される。測定容器 1 0 の内容物を、モニタ装置 6 0 2 上に表示される白色光照明の画像として見ながら、座標指示器 6 0 3 によって、測定すべき赤血球上の点を指定する。そうすると、赤血球上の画面上の位置データがコンピュータ 6 0 に送られ記憶される。

【0 0 2 9】尚、図 4 に示すモニタ装置 6 0 2 の表示画面中の○印は赤血球を表わし、□印は、分光データ取得用に指定された点を表わしている。赤血球（○印）が存在しない点も分光データ取得用に指定（□印）されているのは、測定容器 1 0 の内容物の、赤血球ではない部分（背景部）の分光データを取得し、その分光データで赤血球の部分の分光データを補正するためであり、この補正により、赤血球の、より正確な分光データを得ることができる。

【0 0 3 0】次いで、コンピュータ 6 0 は、高周波発振器 5 2 4 の発振周波数を掃引し、上記のようにして指定された点についての、AOTF 5 2 で分光された結果を画像処理装置 6 0 1 を経由して取り込む。その分光データは表示器 6 5 に表示される。さらに、測定容器 1 0 に被測定溶液を注入し、赤血球と混和させた後、上記と同様にして赤血球の分光データを得る。

【0 0 3 1】コンピュータ 6 0 では、被測定溶液を注入する前後の血液中の赤血球の分光データを基に、上記（1）式、あるいは上記（2）式、あるいは他のデータ演算処理方法により、被測定溶液中の NO の有無の判定が行なわれる。その判定結果は、表示器 6 5 に表示される。尚、上記各実施形態では、赤血球を含有する養液に比測定溶液を混合する前後における赤血球の分光データを得、それら混合前後における分光データに基づいて被測定を溶液中の NO の有無を検出しているが、赤血球を含有する溶液に被測定溶液を混合した後のみの分光データに基づいて被測定溶液中の NO の有無を検出してもよ*

*い。

【0 0 3 2】また、各実施形態では、被測定溶液中の NO の有無のみを問題にしているが、例えば混合前後の分光スペクトルの変化の程度に基づいて NO の含有量もしくは産生量を検出してもよい。さらに、上記各実施形態は、NO を含有する可能性のある溶液を NO の検出対象としたが、液体ではなく気体中の NO を検出対象としてもよく、あるいは NO を産生する可能性のある生体組織等を検出対象としてもよい。

10 【0 0 3 3】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、NO を、NO₂、NO₃とは区別して高精度に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】NO 濃度による赤血球吸収スペクトルの変化を示す図である。

【図 2】本発明の NO 検出装置の一実施形態を示す模式ブロック図である。

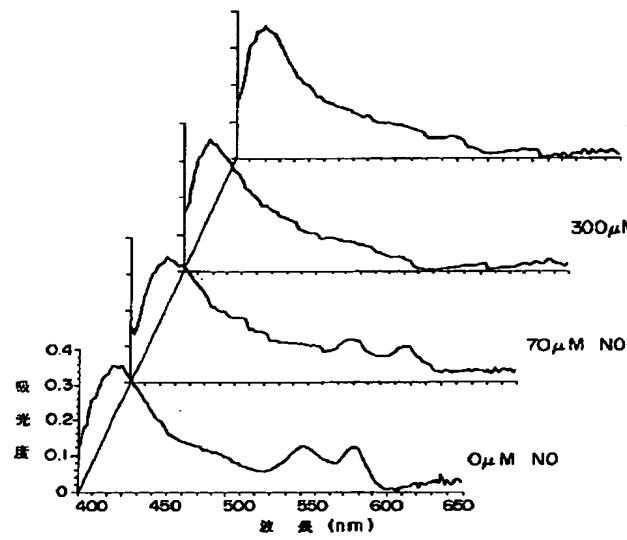
20 【図 3】図 2 に 1 つのブロックで示す分光データ処理部の構成を示すブロック図である。

【図 4】本発明の NO 検出装置のもう 1 つの実施形態を示す模式ブロック図である。

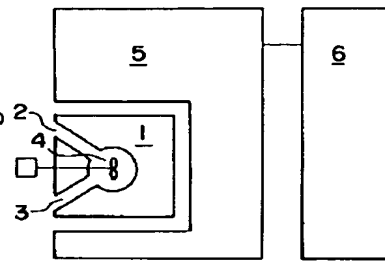
【符号の説明】

- 1 測定物容器
- 2 第 1 の注入口
- 3 第 2 の注入口
- 4 攪拌機
- 5 顕微分光部
- 6 分光データ処理部
- 30 1 0 測定容器
- 5 1 光学顕微鏡
- 5 2 AOTF
- 6 0 コンピュータ
- 6 1 入力インターフェイス部
- 6 2 第 1 の一時メモリ
- 6 3 演算部
- 6 4 第 2 の一時メモリ
- 6 5 表示器
- 5 2 1 テレビカメラ
- 5 2 4 高周波発振器
- 6 0 1 画像処理装置
- 6 0 2 モニタ装置
- 6 0 3 座標指示器
- 40

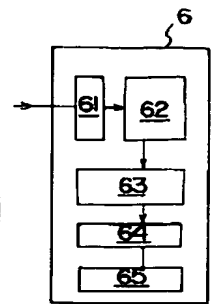
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

